

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

FLACCUS, Rolf-Dieter
Bussardweg 10
D-50389 Wesseling
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 20 June 2001 (20.06.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference LTS 1999/020 PCT	
International application No. PCT/EP00/08919	international filing date (day/month/year) 13 September 2000 (13.09.00)

1. The following indications appeared on record concerning:			
<input type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor	<input checked="" type="checkbox"/> the agent	<input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address FLACCUS, Rolf-Dieter Bussardweg 12 50389 Wesseling Germany		State of Nationality	State of Residence
		Telephone No. 002236/89 33 0	
		Facsimile No. 002236/89 33 33	
		Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:			
<input type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name	<input checked="" type="checkbox"/> the address	<input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence
Name and Address FLACCUS, Rolf-Dieter Bussardweg 10 D-50389 Wesseling Germany		State of Nationality	State of Residence
		Telephone No. 002236/89 33 0	
		Facsimile No. 002236/89 33 33	
		Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:			
4. A copy of this notification has been sent to:			
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned		
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned		
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer F. Baechler
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 23 May 2001 (23.05.01)	
International application No. PCT/EP00/08919	Applicant's or agent's file reference LTS 1999/020 PCT
International filing date (day/month/year) 13 September 2000 (13.09.00)	Priority date (day/month/year) 22 September 1999 (22.09.99)
Applicant LENZ, Jana et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

07 March 2001 (07.03.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:
2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Claudio Borton Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 25 OCT 2001

WIPO PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts LTS 1999/020 PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08919	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 13/09/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 22/09/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N30/46		
Anmelder LTS LOHMANN THERAPIE-SYSTEME AG et al.		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 1 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 07/03/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 23.10.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Klee, B Tel. Nr. +49 89 2399 2675 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-23 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

2-21 ursprüngliche Fassung

1 eingegangen am 04/10/2001 mit Schreiben vom 01/10/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/5-5/5 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 21.

Begründung:

- ☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- ☒ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. 21 sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
- ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	15, 18-20
	Nein: Ansprüche	1-14. 16-17
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	15, 18-20
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-20
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt**

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1. Zitierte Referenzen

D1: WO 99 33862 A

D2: WO 92 02815 A

D3: WO 92 17259 A

Zu Punkt III

Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Siehe Punkt 4. bezüglich Anspruch 21.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

2. Neuheit (Art.33(2) PCT)

2.1 Zu Anspruch 1

D1 offenbart ein Verfahren zur Identifizierung (Seite 6, Zeilen 5-12; Seite 10, Seite 11, Zeile 40) mindestens einer aktiven chemischen Substanz aus einem Gemisch aktiver und inaktiver chemischer Substanzen, gekennzeichnet durch die Schritte:

a) Hinzufügen eines Targets zu diesem Gemisch und Bildung eines Komplexes aus Target und mindestens einer aktiven chemischen Substanz des Gemisches (Seite 2, Zeilen 27-32),

b) Abtrennung des Komplexes von den inaktiven chemischen Substanzen des Gemisches (Seite 2, Zeilen 27-32), und

c) Freisetzung, Isolierung und Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz aus dem abgetrennten Komplex (Seite 3, Zeilen 9-13; Seite 10, Zeile 33 - Seite 11, Zeile 5). Daher ist der Gegenstand des Anspruch 1 nicht neu im Hinblick auf D1.

Die abhängigen Ansprüche 1-14 und 16-17 enthalten keine Merkmale, die in Kombination mit den Merkmalen irgendeines Anspruchs, auf den sie sich beziehen, die Erfordernisse des PCT in bezug Neuheit erfüllen. Die Gründe dafür sind die folgenden:

2.2 Zu den abhängigen Ansprüchen 2-4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Bei dem Verfahrensschritt: Hinzufügen des Targets zu dem Gemischs von chemischen Substanzen in einer **Lösung, Suspension oder Dispersion** handelt es sich um einen für den Fachmann üblichen Verfahrensschritt. Ebenso arbeitet der Fachmann der zum Beispiel mit biochemischen Substanzen arbeitet meistens in gepufferten Systemen (siehe auch D1 Example 1 Tris-puffer pH7.1).

2.3 Zu den abhängigen Ansprüchen 5-7

D1 beschreibt ein Verfahren, in dem der Komplex durch eine Bindung zwischen der aktiven Substanz und dem Target hergestellt wird. Diese Bindung ist nicht-kovalent ("hydrophobic or ionic interaction" Seite 2, Zeile 39).

2.4 Zu den abhängigen Ansprüchen 8-11

D1 beschreibt ein Verfahren, in dem die Abtrennung des Komplexes, Isolierung oder Identifizierung, mittels Ultrafiltration, Ultrazentrifugation oder anderer geeigneter Methoden (HPLC) erfolgt (Seite 10, Zeilen 33-39; Examples).

2.5 Zu den Ansprüchen 12-14

D1 beschreibt ein Verfahren, in dem das Gemisch aktiver und inaktiver Substanzen ein Naturstoffextrakt ist (Seite, 11, Zeilen 7-14).

2.6 Zu den Ansprüchen 16,17

D1 beschreibt ein Verfahren, in dem als Target Antikörper verwendet werden (Seite 11, Zeile 12).

3. Erfinderische Tätigkeit Art.33(3) PCT)

3.1 Zu Anspruch 1 (zweite Alternative Verfahrensschritt d))

Dokument D1, das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird, offenbart ein Verfahren zur Identifizierung (Seite 6, Zeilen 5-12; Seite 10, Seite 11, Zeile 40) mindestens einer aktiven chemischen Substanz aus einem Gemisch aktiver und inaktiver chemischer Substanzen, gekennzeichnet durch die Schritte:

- a) Hinzufügen eines Targets zu diesem Gemisch und Bildung eines Komplexes aus Target und mindestens einer aktiven chemischen Substanz des Gemisches (Seite 2, Zeilen 27-32),
- b) Abtrennung des Komplexes von den inaktiven chemischen Substanzen des Gemisches (Seite 2, Zeilen 27-32), von dem sich der Gegenstand des Anspruchs

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1 dadurch unterscheidet, daß

d) die Identifizierung mindestens einer aktiven Substanz durch Differenzbildung eines Chromatogramms des Gemisches aktiver und inaktiver chemischer Substanzen und eines Chromatogramms des nach Abtrennung des Komplexes erhaltenen Gemisches inaktiver Substanzen.

Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden, ein schnelles Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit dem eine Substanz aus einem Gemisch von Substanzen zu identifiziert werden kann. D2 stellt hierfür dem Fachmann das Verfahren der subtraktiven Chromatographie zu Verfügung (D2 Seite 6, Absatz 1 und Seite 16, 17, Figuren 5, 6). Für den selben Zweck stellt auch D3 das gleiche Verfahren zur Verfügung (Seite 5, 2. Absatz).

Daher ist die zweite Alternative (d)) in Anspruch 1 durch D1 in Verbindung mit D2 oder in Verbindung mit D3 nahegelegt.

3.1 Zu den abhängigen Ansprüchen

Die abhängigen Ansprüche 15, 18, 19, 20 enthalten keine Merkmale, die in Kombination mit den Merkmalen irgendeines Anspruchs, auf den sie sich beziehen, die Erfordernisse des PCT in Bezug auf erfinderische Tätigkeit erfüllen. Die Gründe dafür sind die folgenden:

- Zu Anspruch 15:

Das Verfahren auf ein Gemisch, das mindestens 50 verschiedene Substanzen enthält anzuwenden liegt in dem üblichen Handeln eines Fachmanns.

- Zu den Ansprüchen 18-20

Ebenfalls liegt es im Bereich des fachüblichen Handels bei dem Bedürfnis Thrombin, Trypsin oder den β_2 -Adrenorezeptoren zu analysieren, diese in dem beanspruchten Verfahren einzusetzen.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

4. Klarheit (Art.6 PCT)

Der Anspruch 21 entspricht nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT, weil der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist. In dem Anspruch sind keinerlei Merkmale enthalten, die die Vorrichtung definieren.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Patentanprüche

1. Verfahren zur Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz aus einem Gemisch aktiver und inaktiver chemischer Substanzen, gekennzeichnet durch die Schritte:
- 5
- a) Hinzufügen eines Targets zu diesem Gemisch und Bildung eines Komplexes aus Target und mindestens einer aktiven chemischen Substanz des Gemisches,
- b) Abtrennung des Komplexes von den inaktiven chemischen Substanzen des Gemisches, und
- 10
- entweder
- c) Freisetzung, Isolierung und Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz aus dem abgetrennten Komplex
- oder
- 15
- d) Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz des Gemisches durch Differenzbildung eines Chromatogramms des Gemisches aktiver und inaktiver chemischer Substanzen und eines Chromatogramms des nach Abtrennung des Komplexes erhaltenen Gemisches inaktiver chemischer Substanzen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Patent Claims

1. Process for identifying at least one active chemical substance from a mixture of active and inactive chemical substances, characterized by the steps:

- a) adding a target to said mixture and forming a complex of target and at least one active chemical substance of the mixture,
- b) separating the complex from the inactive chemical substances of the mixture, and

either

- c) liberating, isolating and identifying at least one active chemical substance from the separated complex

or

- d) identifying at least one active chemical substance of the mixture by subtracting from a chromatogram of the mixture of active and inactive chemical substances a chromatogram of the mixture of inactive chemical substances which is obtained after separation of the complex.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESSENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts LTS 1999/020 PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/08919	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 13/09/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 22/09/1999
Anmelder LTS LOHMANN THERAPIE-SYSTEME AG		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☒ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM AUFFINDEN UND ZUR ISOLIERUNG PHARMAKOLOGISHER VERBINDUNGEN AUS SUBSTANZGEMISCHEN

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☒ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 G01N30/46

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

 Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99 33862 A (GENENTECH INC) 8. Juli 1999 (1999-07-08) Seite 2, Zeile 22 -Seite 3, Zeile 85 Seite 5, Zeile 17 -Seite 6, Zeile 28 Seite 7, Zeile 35 -Seite 8, Zeile 29 Seite 10, Zeile 33 -Seite 11, Zeile 6 ---	1-17,21
A	WO 92 02815 A (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS INC) 20. Februar 1992 (1992-02-20) Seite 16, Zeile 19 -Seite 18, Zeile 25 ---	1
A	WO 93 20449 A (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS INC) 14. Oktober 1993 (1993-10-14) Seite 3, letzter Absatz -Seite 4, Absatz 1 Seite 4, letzter Absatz -Seite 5, Absatz 1 Seite 12, letzter Absatz -Seite 13, Absatz 1 --- -/--	1



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Dezember 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

22/12/2000

 Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Zinggrobe, U

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>W0 97 01755 A (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS INC) 16. Januar 1997 (1997-01-16) Zusammenfassung Seite 15 Seite 18, Zeile 16 -Seite 21, Zeile 2 Seite 24, Zeile 24 -Seite 25, Zeile 7 Seite 27, Zeile 27 -Seite 28, Zeile 3 ---</p>	1
A	<p>W0 92 17259 A (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS INC) 15. Oktober 1992 (1992-10-15) Seite 5, Absatz 2 -Seite 7, Absatz 1 ---</p>	1
A	<p>US 5 491 096 A (SPORTSMAN J RICHARD) 13. Februar 1996 (1996-02-13) Zusammenfassung; Abbildung 1 ---</p>	1
A	<p>W0 92 02818 A (PURDUE RESEARCH FOUNDATION) 20. Februar 1992 (1992-02-20) Seite 6, Absatz 2 Seite 11 -Seite 12, Absatz 1 Seite 21 -Seite 22, Absatz 1 Seite 22, Absatz 3 -Seite 23, Absatz 1 ---</p>	1
A	<p>ONNERFJORD P ET AL: "High sample throughput flow immunoassay utilising restricted access columns for the separation of bound and free label" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A,NL,ELSEVIER SCIENCE, Bd. 800, Nr. 2, 27. März 1998 (1998-03-27), Seiten 219-230, XP004113597 ISSN: 0021-9673 Zusammenfassung; Abbildung 1 -----</p>	1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/08919

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N30/46

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 33862 A (GENENTECH INC) 8 July 1999 (1999-07-08) page 2, line 22 -page 3, line 85 page 5, line 17 -page 6, line 28 page 7, line 35 -page 8, line 29 page 10, line 33 -page 11, line 6	1-17,21
A	WO 92 02815 A (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS INC) 20 February 1992 (1992-02-20) page 16, line 19 -page 18, line 25 --- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 December 2000

Date of mailing of the international search report

22/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Zinngrebe, U

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/08919

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 93 20449 A (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS INC) 14 October 1993 (1993-10-14) page 3, last paragraph -page 4, paragraph 1 page 4, last paragraph -page 5, paragraph 1 page 12, last paragraph -page 13, paragraph 1</p>	1
A	<p>WO 97 01755 A (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS INC) 16 January 1997 (1997-01-16) abstract page 15 page 18, line 16 -page 21, line 2 page 24, line 24 -page 25, line 7 page 27, line 27 -page 28, line 3</p>	1
A	<p>WO 92 17259 A (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS INC) 15 October 1992 (1992-10-15) page 5, paragraph 2 -page 7, paragraph 1</p>	1
A	<p>US 5 491 096 A (SPORTSMAN J RICHARD) 13 February 1996 (1996-02-13) abstract; figure 1</p>	1
A	<p>WO 92 02818 A (PURDUE RESEARCH FOUNDATION) 20 February 1992 (1992-02-20) page 6, paragraph 2 page 11 -page 12, paragraph 1 page 21 -page 22, paragraph 1 page 22, paragraph 3 -page 23, paragraph 1</p>	1
A	<p>ONNERFJORD P ET AL: "High sample throughput flow immunoassay utilising restricted access columns for the separation of bound and free label" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A,NL,ELSEVIER SCIENCE, vol. 800, no. 2, 27 March 1998 (1998-03-27), pages 219-230, XP004113597 ISSN: 0021-9673 abstract; figure 1</p>	1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/08919

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9933862	A	08-07-1999	US 6077940 A AU 1814599 A EP 1042358 A	20-06-2000 19-07-1999 11-10-2000
WO 9202815	A	20-02-1992	AU 654503 B AU 8530691 A EP 0548178 A JP 6500396 T	10-11-1994 02-03-1992 30-06-1993 13-01-1994
WO 9320449	A	14-10-1993	AU 3936993 A DE 69319593 D DE 69319593 T EP 0632895 A JP 7505477 T	08-11-1993 13-08-1998 17-12-1998 11-01-1995 15-06-1995
WO 9701755	A	16-01-1997	EP 0835446 A JP 11509314 T	15-04-1998 17-08-1999
WO 9217259	A	15-10-1992	AT 147281 T AU 647929 B AU 1768292 A DE 69216520 D DE 69216520 T EP 0533909 A JP 6500402 T US 5234586 A	15-01-1997 31-03-1994 02-11-1992 20-02-1997 24-04-1997 31-03-1993 13-01-1994 10-08-1993
US 5491096	A	13-02-1996	NONE	
WO 9202818	A	20-02-1992	AU 8654891 A	02-03-1992

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

10/088868

Applicant's or agent's file reference LTS 1999/020 PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/08919	International filing date (day/month/year) 13 September 2000 (13.09.00)	Priority date (day/month/year) 22 September 1999 (22.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 30/46		
Applicant LTS LOHMANN THERAPIE-SYSTEME AG		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>1</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 07 March 2001 (07.03.01)	Date of completion of this report 23 October 2001 (23.10.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/08919

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-23, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 2-21, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 1, filed with the letter of 04 October 2001 (04.10.2001),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/5-5/5, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/08919

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 21

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. _____
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 21
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

See annex

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

national application No.
PCT/EP 00/08919

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

See Box VIII, point 4, with respect to Claim 21.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/08919

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	15, 18-20	YES
	Claims	1-14, 16-17	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	15, 18-20	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. Citations

D1: WO-A-99/33862

D2: WO-A-92/02815

D3: WO-A-92/17259.

2. Novelty (PCT Article 33(2))

2.1 Claim 1

D1 discloses a method for identifying (page 6, lines 5-12; page 10, page 11, line 40) at least one active chemical substance from a mixture of active and inactive chemical substances, characterised by the steps:

- addition of a target to this mixture and formation of a complex of the target and at least one active chemical substance from the mixture (page 2, lines 27-32),
- separation of the complex from the inactive chemical substances of the mixture (page 2, lines 27-32), and
- release, isolation and identification of at least one active chemical substance from the complex that has been separated off (page 3, lines 9-13; page 10, line 33 - page 11, line 5). The subject matter of Claim 1 is therefore not novel over D1.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Dependent Claims 1-14 and 16-17 do not contain any features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the PCT novelty requirements. The reasons for this are as follows:

2.2 Dependent Claims 2-4

The method step involving the addition of the target to the mixture of chemical substances in a **solution, suspension or dispersion** is a standard method step to a person skilled in the art. Likewise, a person skilled in the art who works, for example, with biochemical substances, works for the most part in buffered systems (see also D1, Example 1, Tris buffer pH7.1).

2.3 Dependent Claims 5-7

D1 describes a method in which the complex is produced by bonding the active substance and the target. This bonding is non-covalent ("hydrophobic or ionic interaction", page 2, line 39).

2.4 Dependent Claims 8-11

D1 describes a method in which the separation, isolation or identification of the complex is carried out using ultrafiltration, ultracentrifugation or other suitable methods (HPLC) (page 10, lines 33-39; examples).

2.5 Claims 12-14

D1 describes a method in which the mixture of active and inactive substances is a natural extract (page 11, lines 7-14).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2.6 Claims 16, 17

D1 describes a method in which antibodies are used as the target (page 11, line 12).

3. Inventive Step (PCT Article 33(3))

3.1 Claim 1 (second alternative method step d))

Document D1, which is considered the closest prior art, discloses a method for identifying (page 6, lines 5-12; page 10, page 11, line 40) at least one active chemical substance from a mixture of active and inactive chemical substances, characterised in the steps:

a) addition of a target to this mixture and formation of a complex of the target and at least one active chemical substance from the mixture (page 2, lines 27-32),

b) separation of the complex from the inactive chemical substances of the mixture (page 2, lines 27-32), from which the subject matter of Claim 1 differs in

d) the identification of at least one active substance by the subtraction of a chromatogram of the mixture of active and inactive chemical substances from a chromatogram of the mixture of inactive substances obtained after the complex has been separated off.

The problem addressed by the present invention can therefore be considered that of providing a quick method for identifying a substance from a mixture of substances. D2 suggests that a person skilled in the art use the method of subtractive chromatography therefor (D2, page 6, paragraph 1, and pages 16, 17, Figures 5 and 6). D3 also suggests the same method for the same purpose (page 5, second paragraph).

Therefore, the second alternative (d) in Claim 1 is

THIS PAGE BLANK (USPTO)

suggested by D1 in combination with D2 or D3.

3.1 Dependent claims

Dependent Claims 15, 18, 19 and 20 do not contain any features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the PCT inventive step requirements. The reasons for this are as follows:

- Claim 15:

The use of the method on a substance containing at least 50 different substances is standard practice to a person skilled in the art.

- Claims 18-20

It is likewise standard practice, when needing to analyse thrombin, trypsin or β_2 -adenoreceptors, to use these in the claimed method.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/08919

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

4. Clarity (PCT Article 6)
Claim 21 does not meet the requirements of PCT Article 6 because the subject matter for which protection is sought is not clearly defined. The claim does not contain any features which define the device.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. März 2001 (29.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/22078 A1

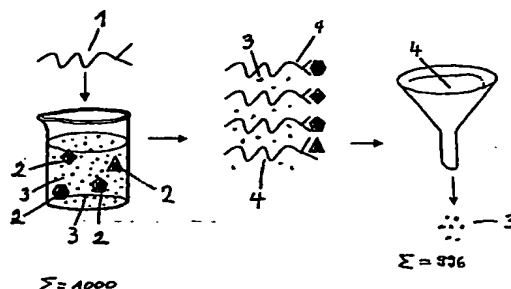
- (51) Internationale Patentklassifikation: G01N 30/46 (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): LTS LOHMANN THERAPIE-SYSTEME AG [DE/DE]; Lohmannstrasse 2, 56626 Andernach (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08919
- (22) Internationales Anmeldedatum: 13. September 2000 (13.09.2000) (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LENZ, Jana [DE/DE]; Institut für Pharmazeutische Chemie, Marbacher Weg 6, 35032 Marburg (DE). MATUSCH, Rudolf [DE/DE]; Institut für Pharmazeutische Chemie, Marbacher Weg 6, 35032 Marburg (DE). HOFFMANN, Hans, Rainer [DE/DE]; Burghofstr. 123, 56566 Neuwied (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 199 45 351.9 22. September 1999 (22.09.1999) DE (74) Anwalt: FLACCUS, Rolf-Dieter; Bussardweg 12, 50389 Wesseling (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR DETECTING AND ISOLATING PHARMACOLOGICAL COMPOUNDS BEING CONTAINED IN SUBSTANCE MIXTURES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM AUFFINDEN UND ZUR ISOLIERUNG PHARMAKOLOGISHER VERBINDUNGEN AUS SUBSTANZGEMISCHEN

Schematische Darstellung der Bildung von Komplexen aus Target und aktiven chemischen Substanzen und ihrer Abtrennung von den inaktiven chemischen Substanzen.



DIAGRAMMATIC VIEW OF THE PRODUCTION OF COMPLEXES MADE OF A TARGET AND ACTIVE CHEMICAL SUBSTANCES AND THE SEPARATION THEREOF FROM THE INACTIVE CHEMICAL SUBSTANCES

(57) Abstract: The invention relates to a method for isolating and/or identifying at least one active chemical substance being contained in a mixture of active and inactive chemical substances. The inventive method is characterised by the steps: a) adding a target to said mixture and producing a complex made of the target and at least one active chemical substance of the mixture, b) separating the complex from the inactive chemical substance of the mixture and either c) releasing and isolating at least one active chemical substance from the separated complex and/or identifying said substance or d) identifying at least one active chemical substance of the mixture by subtracting a chromatogram pertaining to the mixture consisting of active and inactive chemical substances from a chromatogram of the mixture consisting of inactive chemical substances, whereby said last mixture is obtained after the complex has been separated, and optionally releasing and isolating the at least one active substance from the separated complex.

(57) Zusammenfassung: Ein Verfahren zur Isolierung und/oder Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz aus einem Gemisch aktiver und inaktiver chemischer Substanzen ist gekennzeichnet durch die Schritte: (a) Hinzufügen eines Targets zu diesem Gemisch und Bildung eines

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/22078 A1



(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, BR, CA, CN, CZ, HU, IL, IN, JP, KR, MX, NZ, PL, RU, TR, US, ZA.

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Komplexes aus Target und mindestens einer aktiven chemischen Substanz des Gemisches; (b) Abtrennung des Komplexes von den inaktiven chemischen Substanzen des Gemisches; und entweder (c) Freisetzung und Isolierung und/oder Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz aus dem abgetrennten Komplex oder (d) Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz des Gemisches durch Differenzbildung eines Chromatogramms des Gemisches aktiver und inaktiver chemischer Substanzen und eines Chromatogramms des nach Abtrennung des Komplexes erhaltenen Gemisches inaktiver chemischer Substanzen und ggf. Freisetzung und Isolierung der mindestens einen aktiven Substanz aus dem abgetrennten Komplex.

VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM AUFFINDEN UND ZUR ISOLIERUNG PHARMAKOLOGISHER VERBINDUNGEN AUS SUBSTANZGEMISCHEN

5 Beschreibung

Die Arzneimittelforschung hat sich, ausgehend von der Nutzung ausschliesslich natürlicher Quellen über die chemische Synthese von Wirkstoffen und deren Prüfung durch Tierversuche zum gezielten computergestützten Strukturdesign von
10 Wirkstoffen mit Hilfe des Einsatzes experimenteller und theoretischer Methoden hin entwickelt.

Mit zunehmender Kenntnis der verschiedenen Krankheitsursachen (z. B. das Fehlen oder die genetisch bedingte Veränderung eines Proteins) ist die
15 Arzneimittelforschung und die Therapie mit Arzneimitteln wesentlich komplexer geworden. So konnten in den vergangenen zehn Jahren mittels molekularbiologischer Methoden (Humanes Genom Projekt) die genetischen Ursachen einiger primär neurodegenerativer Erkrankungen wie des Morbus Alzheimer, des Morbus Parkinson, des Morbus Huntington, der Amyotrophen Lateralsklerose, der Prionkrankheiten und
20 verschiedener ataxischer Syndrome aufgeklärt werden. Dieses Erkennen der den Krankheiten zugrundeliegenden biologischen Veränderungen stellt die Grundlage für einen Wechsel von einer symptomatischen, palliativen hin zu einer kausalen Therapie dar.

25 100 bis 150 der circa 30.000 in der Medizin beschriebenen Krankheiten sind so relevant, dass sie sich als Forschungsprojekte für die Pharmaindustrie eignen. Die derzeit zur Verfügung stehenden Medikamente zielen auf eine therapeutische Beeinflussung von ca. 400 Rezeptoren, Enzymen und anderen Biomolekülen. Man geht jedoch davon aus, dass etwa bis zu 10.000 Gene und deren Produkte als Target
30 für die Wirkstoffforschung in Frage kommen. Der Nachweis ihrer pathologischen Relevanz erfordert unter anderem aussagekräftige molekulare und zelluläre Systeme.

Neben dem rationalen Design, das die Optimierung von Stoffeigenschaften aufgrund von Erfahrungswerten oder basierend auf bekannten molekularen Strukturen einbezieht, spielen derzeit die Kombinatorische Chemie und die in der Entwicklung befindliche Kombinatorische Biosynthese eine grosse Rolle in der
5 Arzneimittelforschung.

Eine bedeutende Schwachstelle dieser Methoden ist die eingeschränkte Diversität synthetischer Substanzen, verglichen mit der strukturellen Komplexität pflanzlicher und mikrobieller Sekundärmetabolite.

10 Um diese natürliche Vielfalt erschliessen zu können, ist eine enge Verknüpfung der klassischen Naturstoffforschung mit der molekularen Medizin und der organischen Chemie unumgänglich. Auf der Suche nach neuen Leitstrukturen erfolgt die Auswahl pflanzlicher und tierischer Organismen sowie der Pilze und Mikroorganismen nach
15 dem Zufallsprinzip, unter chemotaxonomischen Gesichtspunkten, aufgrund ökologischer Beobachtungen und aufgrund ethnomedizinischer Vorkenntnisse.

Das Auffinden einer oder mehrerer wirksamer Komponente(n) aus Substanzgemischen wie z. B. aus durch Kombinatorische Chemie erstellten
20 Substanzbibliotheken oder aus Naturstoffextrakten ist jedoch sehr aufwendig.

Naturstoffextrakte z. B. bestehen im allgemeinen aus einer Vielzahl (bis zu 2.000) unterschiedlichster, den gesamten Polaritätsbereich umfassenden Substanzen, was durch verschiedenartige Grundstrukturen und funktionelle Gruppen bedingt ist. In der
25 Regel machen hier nur relativ wenige Verbindungen bereits ca. 80 % des Extraktgewichtes aus, während die Überzahl der restlichen Verbindungen jedoch in geringer Konzentration bis hin zum ppm-Bereich, also nicht-equimolar vorliegen. Häufig zeigen in einem solchen Extrakt aber nur wenige oder sogar nur eine einzige Substanz die charakteristische biologische Aktivität, wobei diese Aktivität auf eine im
30 Extrakt in Spuren vorliegende Substanz zurückzuführen sein kann.

Bisher erfolgt das Aufarbeiten und Analysieren der meist chromatografisch getrennten Inhaltsstoffe eines natürlichen Extrakts oder einer mittels Kombinatorischer Chemie hergestellten umfangreichen Substanzbibliothek in der Regel unter Anwendung von automatisierten Testsystemen mit extrem hohem Durchsatz (High-throughput Screening; HTS). Dieses Verfahren ist jedoch sehr aufwendig und kostenintensiv. So ist es erforderlich, aus der Naturstoffquelle (z. B. Pflanze, Tier, Pilz, Mikroorganismus) zunächst selektive Extrakte mit Lösungsmitteln steigender Polarität herzustellen und diese biologisch zu testen. Weitere Tests erfolgen nach der Bildung von Unterfraktionen aus dem jeweils wirksamen selektiven Extrakt.

Schliesslich muss ein letzter Test zeigen, welche Reinsubstanz(en) nach Isolierung aus der wirksamen Fraktion biologische Aktivität zeigen und somit einen "Hit" darstellen. Für die chromatografische Auftrennung in Unterbibliotheken und deren Testung werden jeweils mehrere Wochen benötigt. Um ausreichende Mengen der Reinsubstanz(en) gewinnen zu können, muss daher der Start mit grossen Extraktmengen erfolgen. Auch dies ist verbunden mit hohen Kosten für präparative HPLC-Säulen und den hohen Lösungsmittelbedarf (sowohl Anschaffung als auch Entsorgung).

Bereits durch die Auftrennung in Unterfraktionen, aber erst recht durch die Isolierung der reinen Naturstoffe gehen eventuell vorhandene synergistische oder antagonisierende Effekte der einzelnen Komponenten des Extraktes im Hochdurchsatz-Screening verloren. So kann ein im ersten Test wirksamer Extrakt seine biologische Wirksamkeit einbüssen, weil das Auftrennen zu einzelnen Substanzen eine Targetbindung, die nur im Zusammenspiel verschiedener Komponenten möglich war, verhindert.

Ein Verfahren zum Auffinden wirksamer Komponenten aus einer synthetischen, durch Kombinatorische Chemie erstellten Peptidbibliothek, die aus maximal 19 chemisch sehr ähnlichen, sich nur durch Austausch von Aminosäuren ergebenden und in equimolaren Mengen vorliegenden Peptiden besteht, wird von Zuckermann et

al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 4505-4509 (1992) beschrieben. Dazu wurde ein Antikörper im Unterschuss zu einer solchen Peptid-Substanzbibliothek gegeben und der Target (=Antikörper)-Peptid-Komplex durch schnelle Gelfiltration abgetrennt. Das Peptid wird aus dem Komplex mit 1% Trifluoressigsäure freigesetzt und die
5 Struktur durch Massenspektroskopie und Aminosäureanalyse aufgeklärt. Dieses Verfahren eignet sich aber nicht zur Isolierung von Target-Molekül-Komplexen kleinerer Moleküle (Molekulargewicht kleiner oder gleich 1500), da die Gelfiltration nur mit grösseren Molekulargewichtsunterschieden technisch funktioniert. Auch erfordert es nach Aussage der Autoren equimolare Mischungen. Weiterhin ist die
10 Ermittlung synergistisch wirkender Kombinationen von Liganden unmöglich bzw. dem Zufall überlassen.

Auch die von Wieboldt et al. in *Anal. Chem.*, 69, 1683-1691 (1997) beschriebenen Experimente sind ebenfalls auf equimolare Gemische von 20 bis 30 eng verwandte
15 Moleküle (synthetisch hergestellte Derivate mit einer allgemeinen 1,4-Benzodiazepin-Struktur) gerichtet. Die eingeschränkte Diversität der synthetischen Substanzen erleichtert zwar die experimentelle Bearbeitung, stellt aber zugleich einen begrenzenden Faktor für ihre Anwendbarkeit dar.

Ebenso benötigt die von R. B. van Breemen et al. in *Anal. Chem.*, 69, 2159-2164 (1997) beschriebene gepulste Ultrafiltration Massenspektrometrie eine equimolare Substanzbibliothek mit 20 Substanzen. Da nur mit organischen Lösemitteln freigesetzt wird, können kovalent gebundene Substanzen nicht entdeckt werden.

25 Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher die Entwicklung einer schnell durchführbaren und effizienten Methode zum Auffinden und zur Isolierung von biologisch, z. B. pharmakologisch aktiven chemischen Substanzen und Substanzkombinationen, insbesondere aus nicht equimolaren Gemischen wie Naturstoffextrakten (z. B. aus Pflanze, Tier, Pilz, Mikroorganismus).

Die Aufgabe wird durch ein Verfahren gelöst, das durch folgende Schritte gekennzeichnet ist:

- a) Hinzufügen eines Targets zu einem Gemisch von chemischen Substanzen, z. B. einem Naturstoffextrakt,
- 5 b) Bildung mindestens eines Komplexes aus Target und mindestens einer aktiven chemischen Substanz, wobei diese chemische Substanz an das Target gebunden wird,
- c) Abtrennung der nicht gebundenen chemischen Substanzen des Gemisches von dem mindestens einen Komplex und ggf. deren analytische (z. B. chromatografische) Erfassung (= Hauptversuch).
- 10

Die in einem separaten Versuch ohne Target (Blindprobe) zu ermittelnden, zusätzlich oder in höheren Konzentrationen auftretenden Substanzen stellen die Summe aller vom Target gebundenen Substanzen dar. Diese werden isoliert und strukturell aufgeklärt.

15

Als weitere Schritte zur Aufarbeitung des Komplexes können aber auch die:

- d) Freisetzung der im Komplex an das Target gebundenen mindestens einen aktiven chemischen Substanz unter Zerstörung der Bindung zwischen aktiver chemischer Substanz und dem Target im Komplex, die
- 20 e) Abtrennung der mindestens einen freigesetzten aktiven chemischen Substanz und die
- f) Identifizierung der mindestens einen abgetrennten aktiven chemischen Substanz und ggf. der Vergleich mit den im Schritt c) identifizierten Substanz(en)
- 25

in Frage kommen.

Unter einem biologischen Target versteht man ein Protein (z. B. Rezeptor, Enzym, Antikörper), eine biologische Membran oder eine ganze (gesunde oder Krebs-)Zelle.

Bei Kontakt, insbesondere bei Bindung zwischen einer passenden aktiven chemischen Substanz mit diesem Target kann die Auslösung einer Reaktion erfolgen,

30

die für das Target charakteristisch ist und meist mit einem biochemischen Prozess in Verbindung steht. Mit anderen Worten: Die aktive chemische Substanz besitzt eine starke Affinität zu dem speziellen Target. Beispiele für solche Targets sind die Proteine Thrombin, Trypsin und der β_2 -Adrenorezeptor.

5

Als "chemische Substanz" kommen praktisch alle aus der organischen und Naturstoffchemie bekannten, einheitlichen Stoffe in Frage. Hierzu zählen niedermolekulare und hochmolekulare chemische Stoffe, nicht jedoch Polymere aus einer unbekannten Zahl von Monomereinheiten. Dem Fachmann sind solche chemisch einheitlichen Stoffe der organischen Chemie bekannt. Hierzu zählen aliphatische, aromatische und cyclische Kohlenwasserstoffe und Verbindungen mit funktionellen Gruppen, wie Carbonsäuren, Alkohole, Ester, Aldehyde, Lactone, Amide, Heterocyclen, Isoprenoide, Terpene, Kohlenhydrate, Steroide etc. Auch Glykoside, Peptide, Proteine und Enzyme können als eine geeignete chemische Substanz in Frage kommen.

10

15

Die Molekülmassen geeigneter chemisch einheitlicher Substanzen liegen im allgemeinen oberhalb von $M_r = 150$. So besitzen beispielsweise die bekannten Neurotransmitter Acetylcholin [$H_3CCO-O-CH_2-CH_2-N(CH_3)_3$]OH und Nicotin Molekülmassen von $M_r = 163$ bzw. $M_r = 162$ und beschreiben somit praktisch die Untergrenze der Molekülmasse der geeigneten chemischen Substanzen. Die Obergrenze der Molekülmasse ist prinzipiell nicht beschränkt. So sind hochmolekulare Proteine (M_r bis etwa 300.000) aufgrund ihrer spezifischen Reaktion mit ganz speziellen biologischen Targets durchaus interessante aktive chemisch einheitliche Substanzen, die durch das erfindungsgemäße Verfahren aus einem Gemisch verschiedener chemischer Substanzen abgetrennt werden können.

20

25

Uneinheitliche Biopolymere wie z. B. Glykogen, Cellulose etc. kommen für das erfindungsgemäße Verfahren nicht in Frage kommen, weil sie wegen einer undefinierten Zahl von Monomereinheiten keine chemisch einheitlichen Substanzen im Sinne der vorliegenden Erfindung darstellen.

30

Bei den chemischen Substanzen ist weiterhin zwischen aktiven und inaktiven chemischen Substanzen zu unterscheiden. Unter einer aktiven chemischen Substanz ist eine solche zu verstehen, die befähigt ist, bei Bindung zu einem speziellen Target eine dafür charakteristische Reaktion auszulösen. Eine aktive chemische Substanz ist dadurch charakterisiert, dass sie eine Affinität zum Target besitzt. Eine inaktive chemische Substanz braucht keine Affinität zum Target zu besitzen.

Eine echte Obergrenze der Molmasse der in Frage kommenden chemischen Substanz kann daher nicht beziffert werden. Vielmehr wird nur die Einfachheit der Aufarbeitung im wesentlichen durch das Verhältnis der Molmasse der aktiven chemischen Substanz zur Molmasse des Targets festgelegt. Die Molmasse dieses Targets ist im allgemeinen sehr hoch, und kann z. B. oberhalb von 1 Million liegen. Wie gesagt kann das Target auch eine ganze Zelle sein. Chemische Substanzen mit kleiner Molmasse (etwa 150 bis etwa 30.000) sind von solchen Targets aufgrund der grossen Massendifferenz leicht durch konventionelle Verfahren wie Ultrazentrifugation abzutrennen. Wenn aber die Molmasse der aktiven chemischen Substanz und die Molmasse des Targets in vergleichbaren Grössenordnungen liegen, liefert auch die Ultrazentrifugation nur noch unbefriedigende Trennergebnisse und man muss anspruchsvollere oder zusätzliche Trennverfahren anwenden.

Unter einem "Gemisch von chemischen Substanzen" ist eine Mischung von verschiedenen chemischen Substanzen zu verstehen, die mindestens eine aktive chemische Substanz enthält, die das oben genannte Kriterium erfüllt, d. h. die eine Reaktion bei Kontakt an einem speziellen Target auszulösen vermag. Das Gemisch kann auch mehrere solcher aktiver chemischer Substanzen enthalten. Weiterhin kann das Gemisch auch chemische Substanzen enthalten, die keine Reaktion an einem biologischen Target auszulösen vermögen. In der Regel stellen die inaktiven chemischen Substanzen den Hauptanteil in dem Gemisch verschiedener chemischer Substanzen dar. Insbesondere sind die im Gemisch von chemischen Substanzen enthaltenen inaktiven chemischen Stoffe nur in Bezug auf ein speziell ausgewähltes

Target inaktiv, sind aber durchaus in der Lage, an einem anderen Target eine solche Reaktion auszulösen.

In der Praxis handelt es sich bei dem Gemisch chemischer Substanzen bevorzugt um Substanzbibliotheken, die synthetisch oder mit Hilfe der Kombinatorischen Chemie hergestellt werden oder um einen Naturstoffextrakt. Unter einem Naturstoffextrakt im Sinne dieser Definition sind somit komplexe Gemische chemisch einheitlicher Substanzen zu verstehen, die aus einer biologischen Quelle stammen und vorzugsweise aus Pflanzen, Pflanzenteilen wie Blättern, Blüten, Holz, Wurzeln, Rinde etc., Pilzen, Tieren, Drüsen, Eiern und Exkrementen von Tieren, Mikroorganismen etc. gewonnen werden. Dies geschieht durch bekannte Verfahren, z. B. Wasserdampfdestillation, trockene Destillation, Extraktion mit Wasser, organischen, anorganischen oder überkritischen Lösungsmitteln; häufig auch unter gleichzeitiger bzw. anschließender chemischer Weiterverarbeitung wie Veresterung, Verseifung, Salzbildung, Hydrierung, Dehydratation, Isomerisierungen, Alkylierungen, Fermentation, enzymatischer Abbau etc. Die so gewonnenen Naturstoffextrakte entsprechen also, was die Zusammensetzung ihrer Inhaltsstoffe anbetrifft, mitunter nicht mehr der in der biologischen Quelle vorliegenden Zusammensetzung. Im allgemeinen sind aber eine Vielzahl, d. h. mindestens 50 unterschiedlichster chemischer Substanzen vorhanden, darunter – wie bereits gesagt – zahlreiche nur in Spuren, d. h. in einer Konzentration von nur einigen ppm. Häufig zeigen in einem solchen Extrakt aber nur wenige oder sogar nur eine einzige Substanz die charakteristische biologische Aktivität, wobei diese Aktivität auf eine im Extrakt nur in Spuren vorliegende Substanz zurückzuführen sein kann. Das Gemisch chemischer Substanzen kann auch ein Gemisch verschiedener Naturstoffextrakte sein. Im konkreten Beispiel wurde ein Extrakt aus Löwenzahn (*Taraxacum officinale*) gewählt. Besonders wichtige biologische Quellen stellen natürlich die Heilpflanzen dar, deren Extrakte physiologische und / oder pharmakologische Wirkungen besitzen und zum Teil im DAB und HAB genannt werden.

Das "Hinzufügen" des Targets zu dem Gemisch von chemischen Substanzen erfolgt vorzugweise in Lösung, Suspension oder Dispersion. In vielen Fällen kann das Hinzufügen in einer wässrigen Lösung, insbesondere in einer, deren pH-Wert mit Hilfe eines geeigneten Puffers stabilisiert wird, erfolgen. Es ist ein besonderer Vorteil der hier beschriebenen Methode, dass eine vorangehende Auftrennung des Gemisches von chemischen Substanzen in mehrere verschiedene Fraktionen bis zu reinen chemischen Substanzen vor dem Hinzufügen des Targets nicht erfolgt.

Mit einem "Komplex" ist ein isolierbares Teilchen gemeint, welches aus dem Target besteht, an das mindestens eine aktive chemische Substanz gebunden ist. Ein Target kann auch zwei oder mehrere aktive chemische Substanzen an sich binden. Die in einem solchen Komplex an das Target gebundenen zwei oder mehr aktiven chemischen Substanzen können in einem bestimmten, charakteristischen Verhältnis zueinander vorliegen, welches hinsichtlich der spezifischen Reaktion des speziellen Targets einer synergistischen Wirkung entspricht. Der Fachmann spricht wegen der häufigen Konstellation, dass als Target ein Protein gewählt wird, auch von Protein-Ligand-Komplexen.

Im Komplex ist die mindestens eine aktive chemische Substanz an das Target "gebunden". Dabei spielt die Art der Bindung zwischen Target und der oder den aktiven chemischen Substanz(en) grundsätzlich keine Rolle. Am häufigsten treten kovalente oder nicht-kovalente Bindungen auf. Zu letzteren zählen z. B. Wasserstoffbrücken, elektrostatische Wechselwirkungen, z. B. zwischen entgegengesetzt geladenen Gruppen, Metallkomplexierung, Wechselwirkungen von lipophilen Gruppen der aktiven chemischen Substanz mit hydrophoben Bereichen (sog. Taschen) des Targets, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und Kation- π -Wechselwirkungen. Es ist auch oft die Kombination verschiedener Wechselwirkungen, die die Affinität einer aktiven chemischen Substanz zum Target verursachen.

Die "Abtrennung" des mindestens einen Komplexes von den nicht gebundenen, d. h. den "freien" inaktiven chemischen Substanzen des Gemisches erfolgt grundsätzlich mit üblichen Methoden, wobei besonders vorteilhaft Verfahren ohne thermische Belastung des Komplexes gewählt werden. Dazu zählen Filtration, Ultrafiltration, Zentrifugation, Ultrazentrifugation, Gleichgewichtsdialyse, Gelfiltration oder Präzipitation des Komplexes. Die Identifizierung der mindestens einen an das Target gebundenen "aktiven" chemischen Substanz kann mitunter vor der Freisetzung dieser chemischen Substanz aus dem Komplex, z. B. mit Flugzeitmassenspektroskopie (MALDI-TOF) erfolgen.

Die Filtration stellt eine besonders schnelle, einfache und effiziente Separationsmethode dar. Sie kann als Ultrafiltration (z. B. unter Anwendung von Microcon-Filtereinheiten der Firma Amicon) oder mit speziellen Filtrationsgeräten (z. B. Brandel-Zellsammler) durchgeführt werden.

Die "Freisetzung" der mindestens einen aktiven chemischen Substanz aus dem Komplex erleichtert jedoch ihr Auffinden, Isolieren und insbesondere ihre chemische Charakterisierung. Sie schliesst sich dem Trennungsschritt nach zwei oder mehr Waschgängen zur Entfernung unspezifisch adsorbierter Substanzen an. Es wird dadurch die Freisetzung der gebundenen aktiven chemischen Substanzen aus dem Komplex erzielt. Dabei wird die Bindung, die im Komplex zwischen Target und der mindestens einen aktiven chemischen Substanz besteht, wieder gelöst. Man verwendet dazu – abhängig von der Natur der Bindung – physikalische oder chemische Methoden. Das kann z. B. mittels einer sauren, wässrig-niederalkanolischen Lösung, bevorzugt mit einem Gemisch von Trifluoressigsäure/ Methanol/Wasser, z. B. der Zusammensetzung 1/49,5/49,5 (Vol.-%), erfolgen.

Man kann auf den Freisetzungsschritt verzichten, wenn eine Identifizierung der aktiven chemischen Substanz nicht erforderlich ist bzw. wenn der Komplex als solcher identifiziert wird. Man muss auf die Freisetzung verzichten, wenn sich die aktive Substanz durch die Freisetzungsbedingungen verändert werden würde oder sich

nicht durch die Freisetzungslösung abtrennen lässt. Dies ist hauptsächlich bei einigen kovalenten Bindungen der Fall. In diesen Fällen erfolgt die Identifizierung der aktiven chemischen Substanz aus der Differenz der Filtrate mit Target (= Hauptversuch) und ohne Target (Blindprobe). Dieses Verfahren erlaubt es, alle vom Target gebundenen chemischen Substanzen gleichzeitig zu erfassen, während die Freisetzung in der Regel nur wenige (z. B. eins bis drei) aktive chemische Substanzen ergibt, wobei man zudem nicht sicher sein kann, dass sie unverändert sind.

Die in der Blindprobe zusätzlich oder in höherer Konzentration auftretenden Substanzen stellen die potentiell aktiven chemischen Substanzen dar. Sie können mit einer beliebigen Trennmethode (z. B. chromatografisch) auch in grösseren Mengen aus dem Gemisch chemischer Substanzen (z. B. dem Naturstoffextrakt) isoliert werden.

Die "Abtrennung" der mindestens einen freigesetzten aktiven chemischen Substanz von dem Target nach Zerstörung der im Komplex bestehenden Bindung kann mit denselben, grundsätzlich bekannten Methoden erfolgen, die bereits genannt wurden. Auch hier werden bevorzugt die einfachsten und zweckmässigsten Methoden angewandt, d. h. Filtration und Zentrifugation. Die Abtrennung der aktiven chemischen Substanz(en) kann auch mittels präparativer HPLC erfolgen.

Die "Identifizierung" der in der Blindprobe zusätzlich oder in höherer Konzentration auftretenden Substanzen und der mindestens einen abgetrennten aktiven chemischen Substanz erfolgt durch übliche Methoden, wie HPLC, z. B. konventionelle analytische HPLC, Micro-HPLC, Kapillar-HPLC oder Nano-HPLC, oder durch Elektrochromatografie, Elektrophorese oder Kopplungstechniken von LC-MS oder MS-MS. Die Identifizierung der aktiven chemischen Substanz(en) mittels der genannten Methoden kann allerdings auch bereits vor ihrer Freisetzung aus dem Komplex erfolgen.

Das erfindungsgemässe Verfahren unterscheidet sich grundsätzlich vom bekannten Hochdurchsatz-Screening, und zwar im wesentlichen dadurch, dass durch das gezielte Bilden eines Komplexes aus Target und mindestens einer aktiven chemischen Substanz und dem nachfolgenden Abtrennen der nichtgebundenen inaktiven chemischen Substanzen (Hauptversuch) und der Differenz zur Blindprobe mittels dieses geeigneten speziellen Targets eine einzige oder einige wenige aktive chemische Substanz(en), die sich an das entsprechende Protein binden (sog. "Liganden"), aus einer Substanzbibliothek oder aus einem komplexen Naturstoffgemisch isoliert und identifiziert werden können.

Anstatt jede potentiell interessante chemische Substanz einzeln zu isolieren und dem Target zuzuführen, präsentiert man dieses dem Substanzgemisch. Die sich nach Erkennung entsprechend Emil Fischers "Schlüssel-Schloss-Prinzip" bildenden Komplexe werden z. B. durch Ultrafiltration von den ungebundenen niedermolekularen chemischen Substanzen abgetrennt und durch vergleichende Chromatografie (targetfreie [= Blindprobe] versus targethaltige [= Hauptversuch] Probe) identifiziert. Aus den Komplexen werden dann zur Bestätigung der Ergebnisse die Liganden (die aktiven chemischen Substanzen) zusätzlich freigesetzt – soweit diese stabil und freisetzbar sind –, durch übliche Methoden identifiziert, isoliert und mit den gängigen Methoden der Analytik strukturell aufgeklärt.

Das erfindungsgemässe Verfahren erfordert weder grosse Protein- noch Extraktmengen, benötigt durch Downscaling auf Mikromethoden in der Analytik geringe Lösungsmittelvolumina, erfordert keine zeitintensive Unterfraktionierung, und ermöglicht die Entdeckung synergistisch wirkender Substanzkombinationen. Auf Radioaktiv- und Fluoreszenzmarkierungen kann verzichtet werden. Das erfindungsgemässe Verfahren ermöglicht natürlich auch die Aufarbeitung grösserer Extraktmengen, wobei aktive chemische Substanzen "gefischt" werden können, deren Eigenschaften für die Weiterverwendung dieses Extraktes unerwünscht sind.

Besonders vorteilhaft kann das Verfahren eingesetzt werden, wenn aus grösseren Mengen solcher Extrakte nur die aktiven chemischen Substanzen "gefischt" werden sollen, die eine Wechselwirkung mit dem betreffenden Target zeigen. Die mindestens eine abgetrennte aktive chemische Substanz kann dann anstelle des

5 Naturstoffgemisches als wirksames Prinzip eines Arzneimittels weiterverwendet werden. Dies ist auch dann von Bedeutung, wenn mehr als eine aktive chemische Substanz des Naturstoffextraktes mit dem Target einen Komplex bildet und das relative Verhältnis der mehr als einen aktiven chemischen Substanz zueinander für die biologische Wirksamkeit des Naturstoffextrakts eine dominierende Rolle spielt

10 (Synergieeffekt).

Ein Vorteil dieses Verfahrens liegt somit auch in der Möglichkeit zur Identifizierung von wirksamen (synergistischen) Substanzkombinationen, die beim Hochdurchsatz-Screening von Einzelsubstanzen nicht zugänglich sind.

15 Schliesslich konnte mit Hilfe dieses Verfahrens auch die Erkennungsgrenze (Nachweisgrenze) für aktive chemische Substanzen wider Erwarten in den mikromolaren K_i -Wert-Bereich hinein verschoben werden; d. h. Komplexe aus einem Target und einer aktiven chemischen Substanz mit einem K_i -Wert von 1,7 μ M waren

20 nachweisbar.

Die folgenden Beispiele dienen der anschaulichen Darstellung des erfindungsgemässen Verfahrens.

25 Beispiel 1: Isolierung eines Thrombinhemmstoffes vom 4-Amidinophenylalanin-Typ aus einer willkürlich ausgewählten Substanzbibliothek.

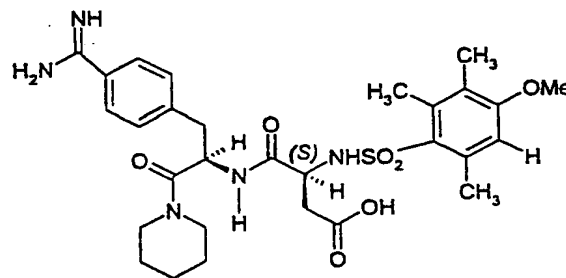
Als Target wurde die Serinprotease Thrombin gewählt. Als Substanzen der Substanzbibliothek (des Gemisches "inaktiver" chemischer Substanzen im Sinne der

30 vorigen Definition) wurden die folgenden fünf Arzneistoffe ausgewählt und zwar

unter Berücksichtigung ihrer Wasserlöslichkeit, ihrer Absorptionsmaxima und ihrer chromatografischen Trennbarkeit:

1. der zentral angreifende α_2 -Adrenorezeptor-Agonist Clonidin-HCl
2. das Mucolytikum Bromhexin-HCl
- 5 3. das tricyclische Antidepressivum Amitryptilin-HCl
4. das Neuroleptikum vom Phenothiazin-Typ Chlorpromazin-HCl
5. das Neuroleptikum vom Phenothiazin-Typ Chlorprotixen-HCl

Als Thrombinhemmstoff (die aktive chemische Substanz) wurde die Verbindung
10 CRC 220 der Behringwerke (Marburg, $K_i = 2,5 \text{ nM}$) mit der folgenden Strukturformel
verwendet:



Die untersuchten Assays hatten folgende Zusammensetzung:

Tabelle 1

Probe	Blindprobe ohne Thrombin	Hauptversuch mit Thrombin
Thrombin 2000 E/mg	0	1 nmol 5 µmol/l
Clonidin-HCl	2 nmol 10 µmol/l	2 nmol 10 µmol/l
Bromhexin-HCl	2 nmol 10 µmol/l	2 nmol 10 µmol/l
Amitriptylin HCl	2 nmol 10 µmol/l	2 nmol 10 µmol/l
Chlorpromazin-HCl	2 nmol 10 µmol/l	2 nmol 10 µmol/l
Chlorprothixen-HCl	2 nmol 10 µmol/l	2 nmol 10 µmol/l
CRC 220	2nmol 10 µmol/l	
0,9 % NaCl in Wasser (reinst)	ad 200 µl	ad 200 µl

- 5 Die Inkubation der Substanzbibliothek und des Inhibitors mit Thrombin erfolgte innerhalb 1 Stunde bei Raumtemperatur; Lösungsmittel: 0,9 % NaCl in H₂O. Die Abtrennung der gebildeten Protein-Ligand-Komplexe erfolgte durch Ultrafiltration (zentrifugal). Alle Filtrationsvorgänge bzw. Waschungen wurden bis zur Trockenheit der Filter durchgeführt.

10

Filter: Microcon 10 (Amicon)

Zentrifugationsbedingungen: 9981xg, Raumtemperatur

Waschschritte: 2 x mit je 150 µl 0,9 % NaCl in H₂O, 4 °C

15

Nach der Ultrafiltration und Analyse des Filtrats folgten Waschschritte und die Freisetzung des Liganden (der aktiven chemischen Substanz) aus dem auf dem

Filter verbliebenen Protein-Ligand-Komplex durch Behandlung mit 200 µl Wasser/Methanol/TFA (49,5/49,5/1) bei Raumtemperatur.

Die Blindprobe (ohne Thrombin) wurde in allen Schritten analog behandelt, so dass ein Vergleich der Filtrate möglich ist. Die bei allen Schritten erhaltenen Filtrate wurden mittels Speed-VAC Concentrator getrocknet und später im entsprechenden HPLC-Fliessmittel definierter Menge unter Anwendung von Ultraschall und Schütteln gelöst.

Die Identifizierung der Liganden erfolgte durch analytische HPLC: stationäre Phase Hypersil C 18 BDS, 3 µm, 150 * 0,3mm; Fusica (LC Packings) – mobile Phase: Acetonitril/Wasser/TFA (35/65/01), isokratisch, 5 µl/min, λ = 230 nm. Die Ergebnisse sind in Fig. 2 dargestellt.

Die Differenz zwischen Hauptversuch und Blindprobe ist CRC 220 als aktive chemische Verbindung. Da Clonidin-HCl (4,6 min) weder im Hauptversuch noch in der Blindprobe auftritt, wird es nicht vom Target, sondern vom Filter gebunden. Es ist kein Inhibitor.

Beispiel 2: Bindung nicht equimolarer Gemische von Amidinophenylalaminen unterschiedlicher Bindungsstärke an Trypsin.

Es wurden die im folgenden durch ihre Strukturformeln wiedergegebenen Trypsin-Hemmstoffe von 3-Amidinophenylalamin-Typ als chemische Substanzen und die Serinprotease Trypsin als Target verwendet:

Tabelle 3

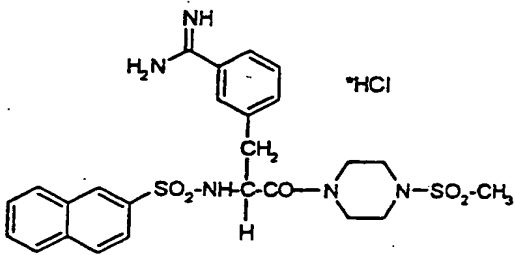
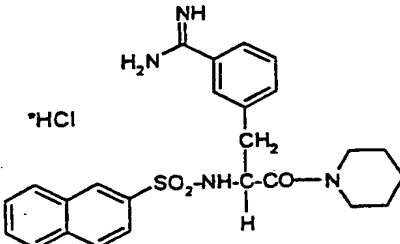
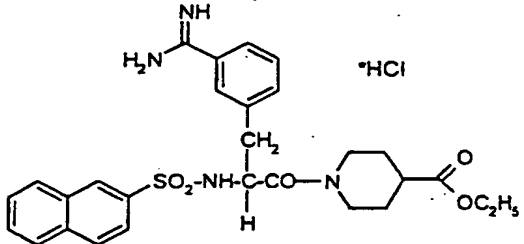
Nr.	Struktur N alpha/P2/ C alpha	Formel	Ki [μM I/I]	Ki [μM I/I]
Thrombin	Trypsin			
6 (120)*HCl	$\beta\text{Nas/-/}$ Pzd-N-SMe		0,0021	0,067
7 (105-95) *HCl	$\beta\text{Nas/-/Ppd}$		0,065	0,33
10 (110-79) *HCl	$\beta\text{Nas/-/}$ iNip-Oet		0,36	0,02

Tabelle 4: Zusammensetzung der Assays

Probe	Trypsin 10.600 E/mg	6 ($K_i=67$ nM)	7 ($K_i=330$ nM)	10 ($K_i=20$ nM)	0,9 % NaCl in Wasser (reinst)
261; 300	0	1,68 nmol 8,4 $\mu\text{mol/l}$	8,25 nmol 41,25 $\mu\text{mol/l}$	0,5 nmol 2,5 $\mu\text{mol/l}$	ad 200 μl
262; 301; 302	10 nmol 50 $\mu\text{mol/l}$	1,68 nmol 8,4 $\mu\text{mol/l}$	8,25 nmol 41,25 $\mu\text{mol/l}$	0,5 nmol 2,5 $\mu\text{mol/l}$	ad 200 μl

Die Versuche wurden durchgeführt wie in Beispiel 1 beschrieben.

Tabelle 5: Ergebnisse

Probe	Substanz	Filtrat [$\mu\text{mol/l}$]	1. Waschung [$\mu\text{mol/l}$]	2. Waschung [$\mu\text{mol/l}$]	Freisetzung [$\mu\text{mol/l}$]
261	6	7,44	0,71	0,05	0,01
	7	31,57	3,13	0,26	0,13
	10	0,05	0,02	0,0013	0,0011
262	6	0,67	0,23	0,15	6,09
	7	22,22	3,68	1,29	8,49
	10	0,02	0,0058	0,0012	0,53

5

Beispiel 3: Isolierung und Identifizierung von Naturstoffen aus Taraxacum-Extrakt

Für die Assays verwendete Substanzen:

- 10 a) Extr. Taraxaci spir. sicc. (Naturstoff-Trockenextrakt der Firma Caelo)
Herstellung von wässrigen Lösungen:
- Suspension der Trockenextrakte in Wasser (0,2 g in 20 ml)
 - 5 min Behandlung im Ultraschallbad, 30 min Stehen unter gelegentlichem Schütteln
 - 15 - Filtration durch Membranfilter (0,7 μm), anschliessend durch Anotop 25-Filter (0,02 μm)
 - Prüfung auf Gerbstoffe mittels FeCl_3 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_4$ und Gelatine: negativ
- b) β_2 -Adrenorezeptor (= Target)
- 20 - Membranpräparation aus Sf9-Insektenzellen, die 3 Tage mit einem rekombinanten β_2 -adrenergen-Rezeptor-Baculovirus infiziert worden waren (Zellen und Viren, Plasmidkonstruktion, Isolierung des rekombinanten Baculovirus und Präparation der Membranen: MPI für Biophysik, Abt. für Molekulare Membranbiologie, Frankfurt/Main, Dr. Helmut Reiländer)
 - 25 [H. Reiländer, *Febs letters*, 282, 441-444 (1991)]

In den Assays wurden der Taraxacum-Extrakt und die Membranpräparation in unterschiedlichen stöchiometrischen Verhältnissen, gelöst in 200 µl Bindungspuffer (150mM NaCl, 50mM Tris, pH 8,2 in Wasser) kombiniert.

5

Die Rezeptor-Ligand-Bindung wurde vervollständigt durch 30 Minuten lange Inkubation der Mischung bei 30-34 °C. Die Lösungen wurden dann auf ein Microcon 10-Zentrifugalfilter gegeben und bei 9981xg 15 min lang bzw. bis zur Trockenheit des Filters zentrifugiert. Der Vergleich der Chromatogramme der Proben mit (= Hauptversuch) und ohne Rezeptor (= Blindprobe) führte zur Identifizierung der gebundenen chemischen Substanzen. Nach zwei Waschschritten mit Bindungspuffer wurden die auf dem Filter befindlichen Komplexe getrennt durch Behandlung mit 200 µl TFA (1/49,5/49,5).

10

15 Tabelle 6: Zusammensetzung der Assays:

Probe	β_2 -adrenerger Rezeptor (Membranpräparation 10/98; 6,5 pmol Rezeptor pro mg Protein)	Extr. Taraxaci (10mg/ml wässriger Extrakt, filtriert durch Anotop 25- Filter (Merck))	Bindungspuffer (150mM NaCl; 50mM Tris; pH 8,2)
351	0	1,5 mg 7,5 g/l	ad 200 µl
355	1,04 pmol 5,2 nmol/l	1,5 pmol 7,5 nmol/l	ad 200 µl
356	1,04 pmol 5,2 nmol/l	1,5 pmol 7,5 nmol/l	ad 200 µl
360	0	0,3 mg 1,5 g/l	ad 200 µl
361	1,04 pmol 5,2 nmol/l	0,3 mg 1,5 g/l	ad 200 µl
362	0	0,6 mg 3 g/l	ad 200 µl

363	1,04 pmol 5,2 nmol/l	0,6 mg 3 g/l	ad 200 µl
364	0	1,0 mg 5,0 g/l	ad 200 µl
365	1,04 pmol 5,2 nmol/l	1,0 mg 5,0 g/l	ad 200 µl
366	1,04 pmol 5,2 nmol/l	1,5 mg 7,5 g/l	ad 200 µl
367	1,04 pmol 5,2 nmol/l	1,5 mg 7,5 g/l	ad 200 µl
369	1,04 pmol 5,2 nmol/l	1,5 mg 7,5 g/l	ad 200 µl
373	1,04 pmol 5,2 nmol/l	1,5 mg 7,5 g/l	ad 200 µl
374	0,52 pmol 2,6 nmol/l	1,5 mg 7,5 g/l	ad 200 µl
375	0,26 pmol 1,3 nmol/l	1,5 mg 7,5 g/l	ad 200 µl

Die Eluate von den folgenden vier Filtrationsschritten wurden im Vakuum bis zur Trockne zentrifugiert und die erhaltenen Substanzen in 10 µl der mobilen Phase der HPLC (vergl. Beispiel 1) kurz vor der LC-Analyse mittels Ultraschall in Lösung gebracht.

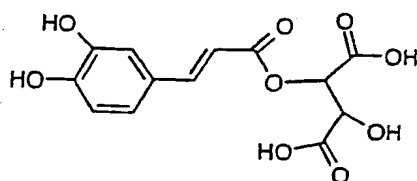
5

Tabelle 7: Ergebnisse

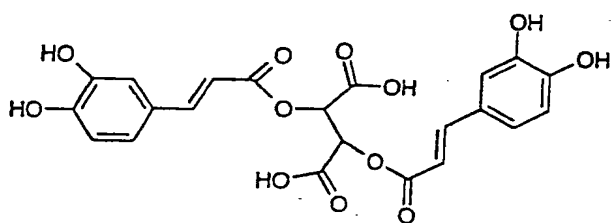
Probe	Substanz	Filtrat [nmol/l]	1. Waschung [nmol/l]	2. Waschung [nmol/l]	Freisetzung [nmol/l]
351	L3	740,3	51,0	8,0	11,9
	L6	5970,7	15045	750,8	195,0
	L7	3802,1	748,2	145,5	22,7
355	L3	353,5	88,8	12,9	15,8
	L6	1482,0	451,4	100,4	707,0
	L7	1539,6	909,9	180,4	214,5
356	L3	961,9	79,0	9,9	26,3
	L6	1848,6	600,1	202,1	2199,1

	L7	2183,1	1117,4	295,9	510,7
360	L3	411,5	22,7	0	8,1
	L6	2935,2	468,9	140,3	34,7
	L7	1268,8	129,6	6,6	8,6
361	L3	537,0	16,5	29,6	11,2
	L6	1588,2	146,5	124,3	138,1
	L7	1268,8	129,6	6,6	8,6
362	L3	650,1	20,5	5,6	3,2
	L6	3446,6	958,0	351,4	85,4
	L7	1423,2	176,5	33,7	7,5
363	L3	736,9	54,4	0	8,7
	L6	1180,6	248,3	142,0	257,0
	L7	1740,7	76,4	104,2	16,9
364	L3	1034,4	36,9	3,0	5,3
	L6	3752,4	1377,0	627,8	151,3
	L7	1829,6	92,7	30,1	89,6
365	L3	1221,4	51,7	8,6	9,8
	L6	2291,6	626,7	141,6	436,9
	L7	2746,8	74,0	11,2	111,9
366	L3	2088,5	102,8	2,3	7,6
	L6	5581,8	620,0	181,5	504,8
	L7	4261,6	1425,3	213,1	168,2
367	L3	2310,8	46,2	15,6	6,3
	L6	5159,0	832,5	274,6	616,8
	L7	6243,7	1509,0	199,2	232,9
369	L3	2381,4	90,8	41,8	7,0
	L6	7449,7	478,1	341,9	674,0
	L7	3505,8	986,8	221,7	378,7
373	L3	2450,0	91,7	26,6	36,2
	L6	5562,6	182,7	277,1	2096,1
	L7	4900,2	1176,5	285,4	847,8
374	L3	2593,2	44,0	7,4	25,3
	L6	8589,0	1062,4	476,6	1015,4
	L7	5661,6	627,7	200,9	538,8
375	L3	2252,1	39,7	19,6	19,0
	L6	10838,5	921,1	433,9	279,9
	L7	4921,4	631,3	112,3	154,4

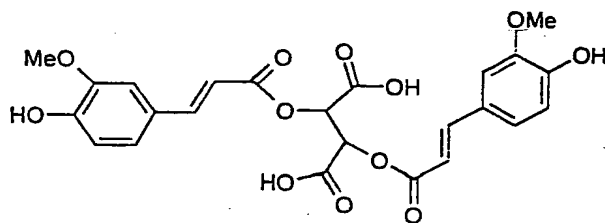
Die drei "gefishchten", d. h. durch Komplexbildung und anschliessende Freisetzung aus dem Komplex erhaltenen Liganden (L3 = trans-Caftarinsäure, L6 = trans-Chicorinsäure und L7 = trans-Diferoyl-weinsäureester) konnten mittels UV, ¹H-NMR und MS identifiziert werden.



L3



L6



L7

Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1 zeigt eine symbolische Darstellung der Bildung des mindestens einen Komplexes. Zu einem Gemisch von 1000 verschiedenen, nicht equimolaren chemisch einheitlichen Substanzen (davon vier aktiven) wird ein Target hinzugefügt. Es entstehen vier verschiedene Komplexe, die jeweils eine der aktiven chemischen Substanz gebunden enthalten. Die 996 inaktiven Substanzen können dann mittels Ultrafiltration von den Komplexen abgetrennt werden. Es bedeuten:

- 1 = Target
- 2 = diverse aktive chemische Substanzen
- 3 = diverse inaktive chemische Substanzen (Punkte)
- 4 = verschiedene Komplexe mit mindestens einer aktiven chemischen Substanz

Die Fig. 2 zeigt:

- A) Gemisch chemischer Substanzen mit Inhibitor CRC 220
Clonidin-HCl (4,6 min), CRC 220 (6,9 min), Bromhexin (12,3 min), Amitryptilin (17,6 min), Chlorpromazin-HCl (23,9 min), Chlorprothixen-HCl (26,9 min)
- B) Filtrat ohne Target [Blindprobe]
- C) Filtrat mit Target Thrombin [Hauptversuch]

Die in Fig. 3 enthaltenen Chromatogramme zeigen:

- A) Taraxacum (Blindprobe)
- B) Taraxacum (Hauptversuch)
- C) Taraxacum Freisetzung

Die Differenz zwischen Blindprobe und Hauptversuch zeigt, dass ca. 12 Substanzen gebunden sind, während die durch die Freisetzungsmethode nur 3 Substanzen ermittelt werden konnten.

Patentanprüche

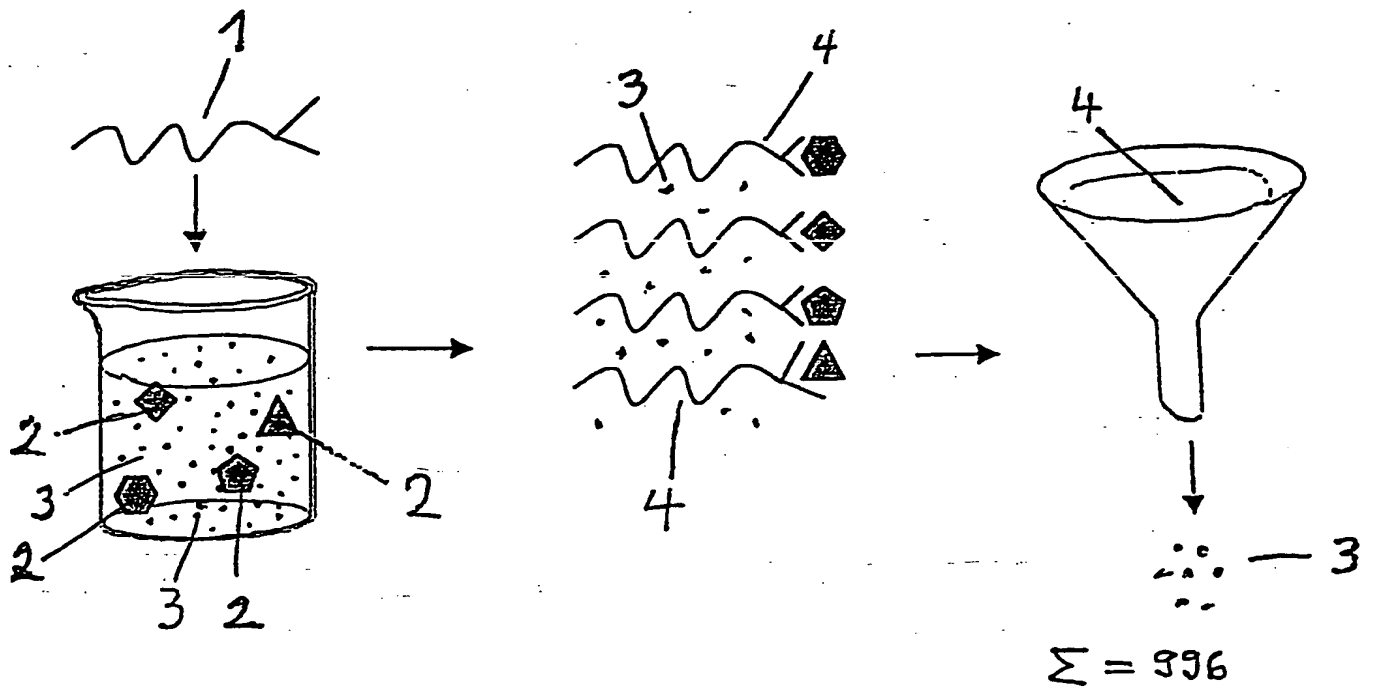
1. Verfahren zur Isolierung und / oder Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz aus einem Gemisch aktiver und inaktiver chemischer Substanzen, gekennzeichnet durch die Schritte:
- 5 a) Hinzufügen eines Targets zu diesem Gemisch und Bildung eines Komplexes aus Target und mindestens einer aktiven chemischen Substanz des Gemisches,
- b) Abtrennung des Komplexes von den inaktiven chemischen Substanzen des Gemisches, und
- 10 entweder
- c) Freisetzung und Isolierung und / oder Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz aus dem abgetrennten Komplex
- oder
- 15 d) Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz des Gemisches durch Differenzbildung eines Chromatogramms des Gemisches aktiver und inaktiver chemischer Substanzen und eines Chromatogramms des nach Abtrennung des Komplexes erhaltenen Gemisches inaktiver chemischer Substanzen und ggf. Freisetzung
- 20 und Isolierung der mindestens einen aktiven Substanz aus dem abgetrennten Komplex.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Hinzufügen des Targets zu dem Gemisch von chemischen Substanzen in einer Lösung, einer Suspension oder einer Dispersion erfolgt.
- 25 3. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Hinzufügen in einer wässrigen Lösung erfolgt.
4. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert der wässrigen Lösung mit Hilfe eines geeigneten Puffers stabilisiert wird.
- 30 5. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Komplex durch eine Bindung zwischen der

mindestens einen aktiven chemischen Substanz und dem Target hergestellt wird.

6. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Bindung um eine kovalente oder nicht-kovalente Bindung handelt.
7. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der nicht-kovalenten Bindung um Wasserstoffbrücken, elektrostatische Wechselwirkungen, Metallkomplexierung, Wechselwirkungen von lipophilen Gruppen der aktiven chemischen Substanz mit dem Target, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen oder um Kation- π -Wechselwirkungen handelt.
8. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Abtrennung des Komplexes von den inaktiven chemischen Substanz mittels Ultrafiltration, Ultrazentrifugation oder anderer geeigneter Methoden erfolgt.
9. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Isolierung und / oder Identifizierung der mindestens einen aktiven chemischen Substanz des abgetrennten Komplexes mit Methoden wie HPLC, Elektrochromatografie, Elektrophorese, Kopplungstechniken wie LC-MS oder MS-MS, vorzugsweise mittels Mikro-Kapillar- oder Nano-HPLC erfolgt.
10. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Identifizierung der mindestens einen aktiven chemischen Substanz des Gemisches mit Methoden wie HPLC, Elektrochromatografie, Elektrophorese, Kopplungstechniken wie LC-MS oder MS-MS, vorzugsweise mittels Mikro-Kapillar- oder Nano-HPLC erfolgt.
11. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Abtrennung der mindestens einen aktiven chemischen Substanz aus dem Gemisch mittels präparativer HPLC, Elektrochromatografie oder Elektrophorese erfolgt.

12. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Gemisch aktiver und inaktiver chemischer Substanzen eine Substanzbibliothek, erhalten aus synthetischer oder kombinatorischer Chemie, oder ein Naturstoffextrakt ist.
- 5 13. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Gemisch chemischer Substanzen ein chemisch modifizierter Naturstoffextrakt ist.
14. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Gemisch chemischer Substanzen ein Gemisch verschiedener Naturstoffextrakte ist.
- 10 15. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Gemisch aktiver und inaktiver chemischer Substanzen mindestens 50 verschiedene chemische Substanzen enthält.
16. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Target ein Protein ist.
- 15 17. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Target ein Enzym, ein Rezeptor, ein Antikörper, eine biologischen Membran oder eine Zelle ist.
18. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Target das Enzym Thrombin ist.
- 20 19. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Target der Rezeptor Trypsin ist.
20. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Target der β_2 -Adrenozeptor ist.
- 25 21. Vorrichtung zur kombinierten Durchführung des Verfahrens gemäss Anspruch 1.

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Bildung von Komplexen aus Target und aktiven chemischen Substanzen und ihrer Abtrennung von den inaktiven chemischen Substanzen.



THIS PAGE BLANK (USPTO)

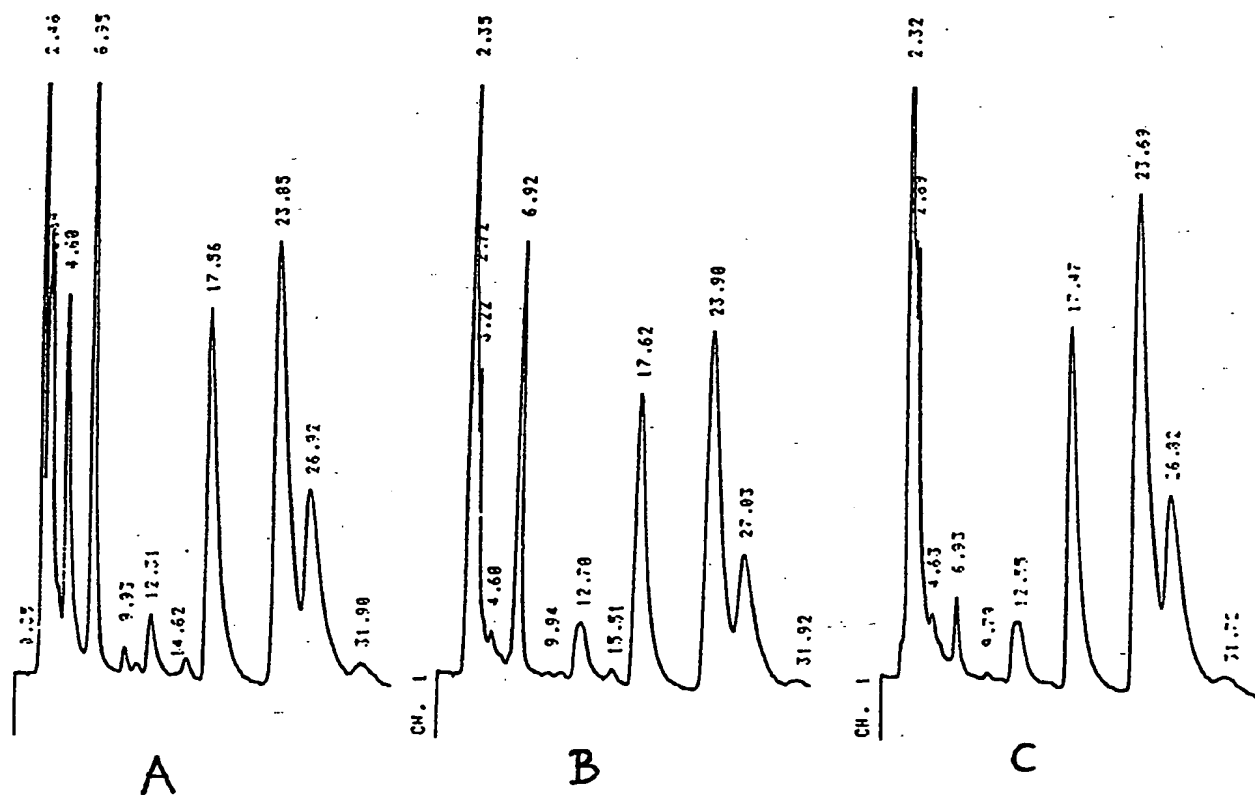
Abbildung 2: Chromatogramme eines Gemisches aktiver und inaktiver chemischer Substanzen, sowie von Hauptversuch und Blindprobe.

A) Gemisch chemischer Substanzen mit Inhibitor CRC 220

Clonidin-HCl (4,6 min), CRC 220 (6,9 min), Bromhexin (12,3 min), Amitryptilin (17,6 min), Chlorpromazin-HCl (23,9 min), Chlorprothixen-HCl (26,9 min)

B) Filtrat ohne Target [Blindprobe]

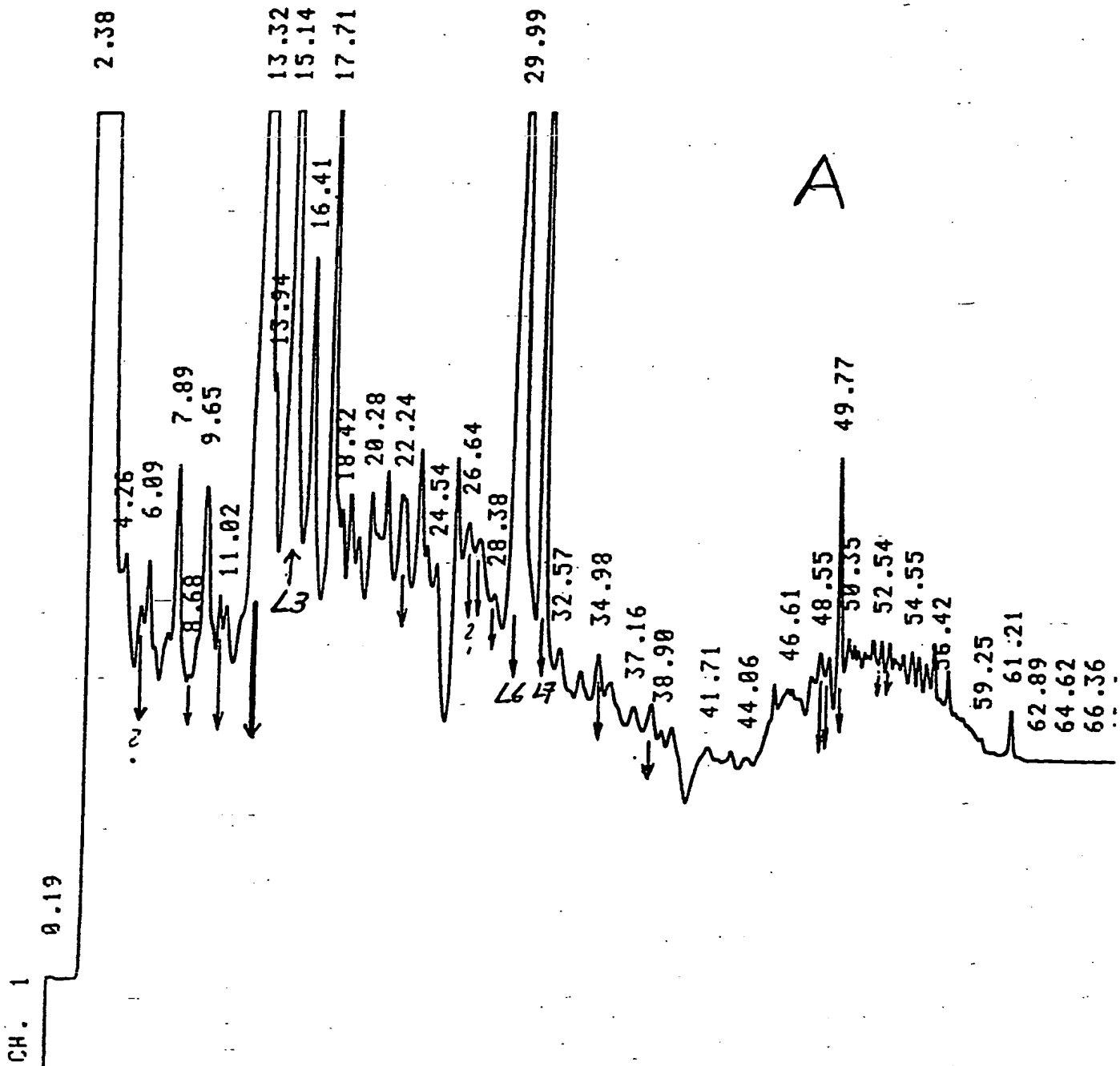
C) Filtrat mit Target Thrombin [Hauptversuch]



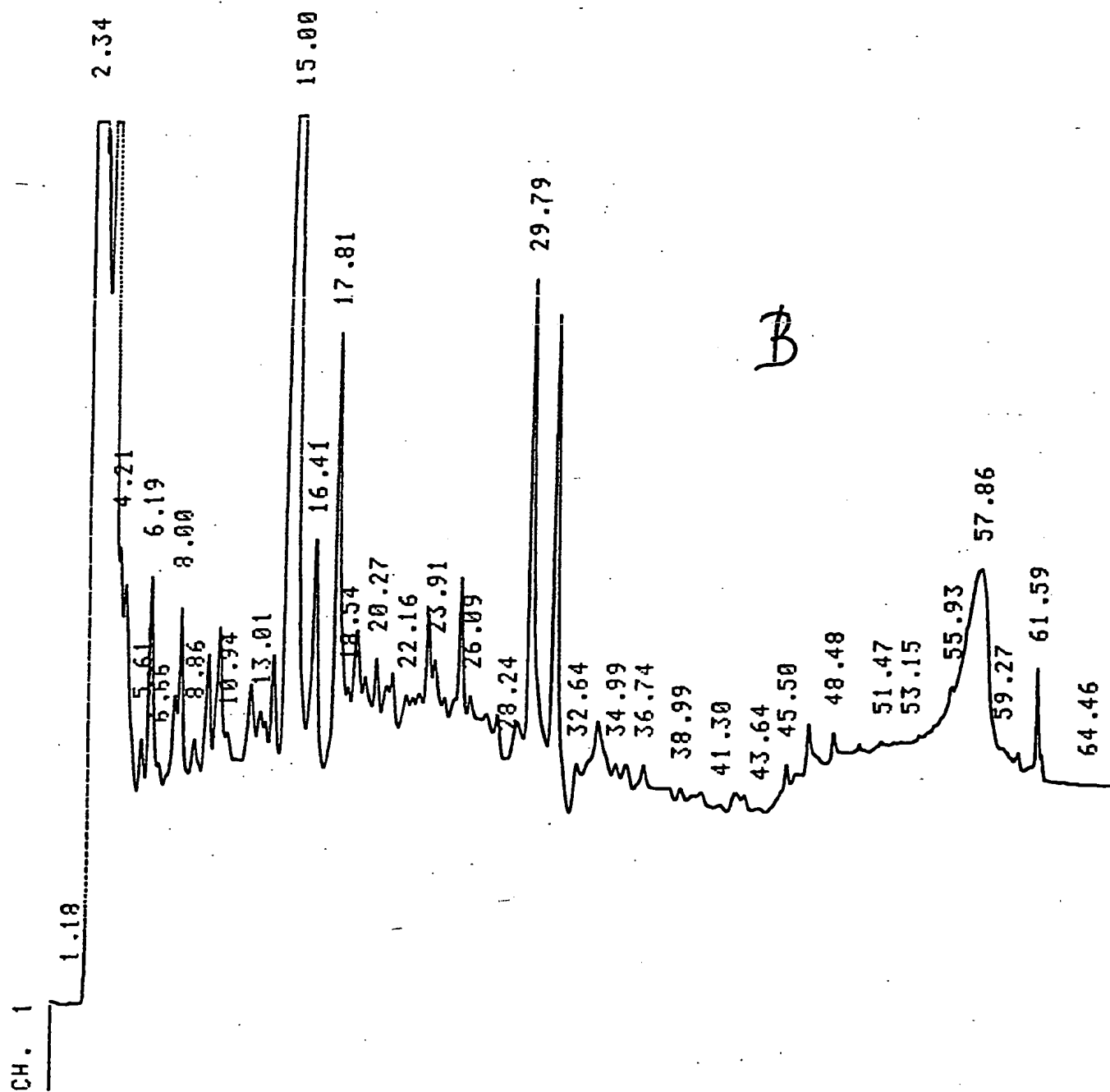
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Abbildung 3: Chromatogramme:

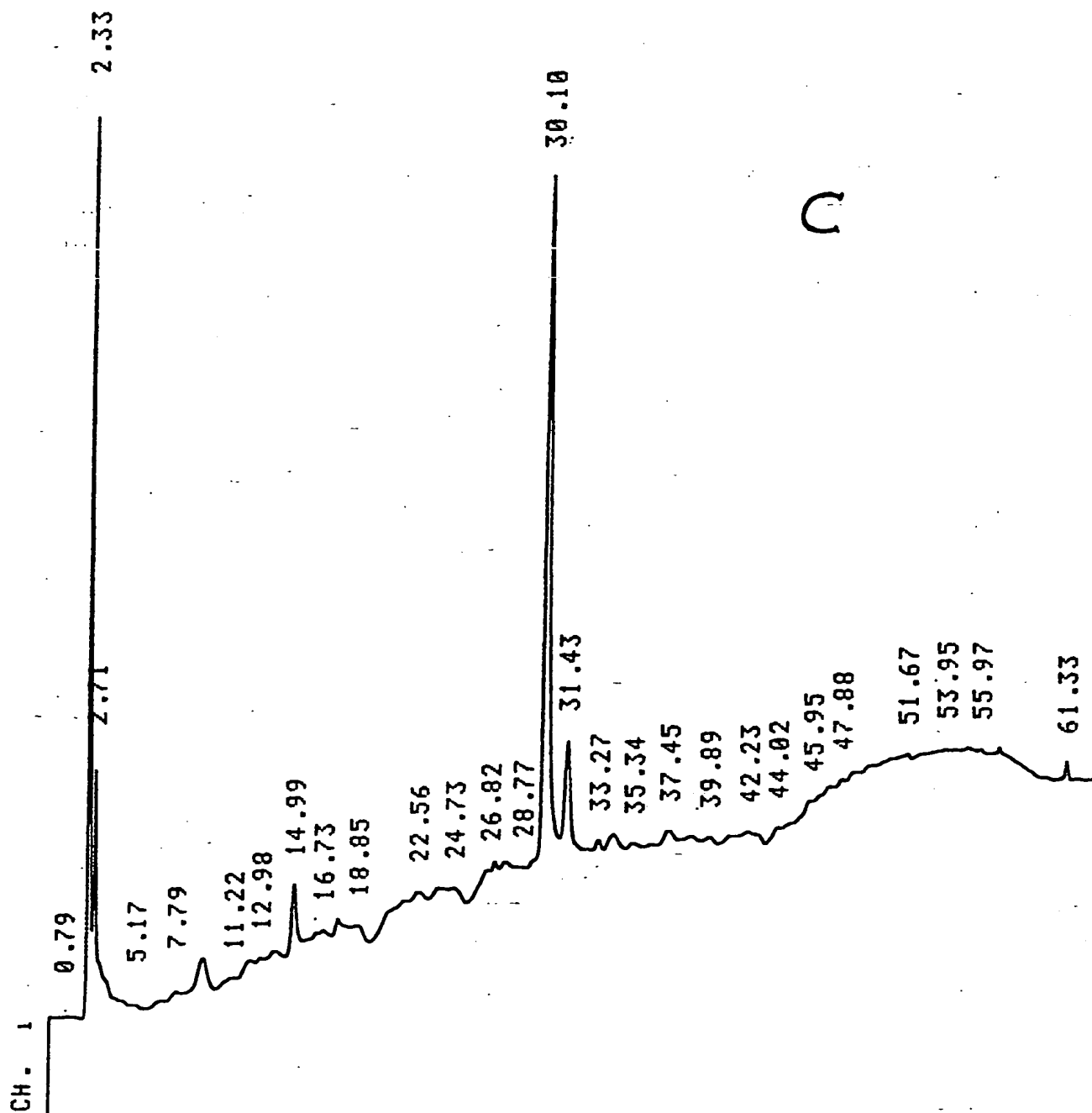
- A) Taraxacum (Blindprobe)
- B) Taraxacum (Hauptversuch)
- C) Taraxacum Freisetzung



THIS PAGE BLANK (USPTO)



THIS PAGE BLANK (USPTO)



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/08919

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N30/46

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 33862 A (GENENTECH INC) 8 July 1999 (1999-07-08) page 2, line 22 -page 3, line 85 page 5, line 17 -page 6, line 28 page 7, line 35 -page 8, line 29 page 10, line 33 -page 11, line 6	1-17, 21
A	WO 92 02815 A (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS INC) 20 February 1992 (1992-02-20) page 16, line 19 -page 18, line 25 --- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 December 2000

Date of mailing of the international search report

22/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Zinngrebe, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Internat Application No.
 PCT/EP 00/08919

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 93 20449 A (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS INC) 14 October 1993 (1993-10-14) page -3, last paragraph -page 4, paragraph 1 page 4, last paragraph -page 5, paragraph 1 page 12, last paragraph -page 13, paragraph 1 ---	1
A	WO 97 01755 A (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS INC) 16 January 1997 (1997-01-16) abstract page 15 page 18, line 16 -page 21, line 2 page 24, line 24 -page 25, line 7 page 27, line 27 -page 28, line 3 ---	1
A	WO 92 17259 A (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS INC) 15 October 1992 (1992-10-15) page 5, paragraph 2 -page 7, paragraph 1 ---	1
A	US 5 491 096 A (SPORTSMAN J RICHARD) 13 February 1996 (1996-02-13) abstract; figure 1 ---	1
A	WO 92 02818 A (PURDUE RESEARCH FOUNDATION) 20 February 1992 (1992-02-20) page 6, paragraph 2 page 11 -page 12, paragraph 1 page 21 -page 22, paragraph 1 page 22, paragraph 3 -page 23, paragraph 1 ---	1
A	ONNERFJORD P ET AL: "High sample throughput flow immunoassay utilising restricted access columns for the separation of bound and free label" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A,NL,ELSEVIER SCIENCE, vol. 800, no. 2, 27 March 1998 (1998-03-27), pages 219-230, XP004113597 ISSN: 0021-9673 abstract; figure 1 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/08919

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9933862	A	08-07-1999	US 6077940 A AU 1814599 A EP 1042358 A	20-06-2000 19-07-1999 11-10-2000
WO 9202815	A	20-02-1992	AU 654503 B AU 8530691 A EP 0548178 A JP 6500396 T	10-11-1994 02-03-1992 30-06-1993 13-01-1994
WO 9320449	A	14-10-1993	AU 3936993 A DE 69319593 D DE 69319593 T EP 0632895 A JP 7505477 T	08-11-1993 13-08-1998 17-12-1998 11-01-1995 15-06-1995
WO 9701755	A	16-01-1997	EP 0835446 A JP 11509314 T	15-04-1998 17-08-1999
WO 9217259	A	15-10-1992	AT 147281 T AU 647929 B AU 1768292 A DE 69216520 D DE 69216520 T EP 0533909 A JP 6500402 T US 5234586 A	15-01-1997 31-03-1994 02-11-1992 20-02-1997 24-04-1997 31-03-1993 13-01-1994 10-08-1993
US 5491096	A	13-02-1996	NONE	
WO 9202818	A	20-02-1992	AU 8654891 A	02-03-1992

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 00/08919

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N30/46

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99 33862 A (GENENTECH INC) 8. Juli 1999 (1999-07-08) Seite 2, Zeile 22 -Seite 3, Zeile 85 Seite 5, Zeile 17 -Seite 6, Zeile 28 Seite 7, Zeile 35 -Seite 8, Zeile 29 Seite 10, Zeile 33 -Seite 11, Zeile 6	1-17,21
A	WO 92 02815 A (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS INC) 20. Februar 1992 (1992-02-20) Seite 16, Zeile 19 -Seite 18, Zeile 25	1
A	WO 93 20449 A (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS INC) 14. Oktober 1993 (1993-10-14) Seite 3, letzter Absatz -Seite 4, Absatz 1 Seite 4, letzter Absatz -Seite 5, Absatz 1 Seite 12, letzter Absatz -Seite 13, Absatz 1	1

	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Dezember 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

22/12/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Zinngrebe, U

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>WO 97 01755 A (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS INC) 16. Januar 1997 (1997-01-16) Zusammenfassung Seite 15 Seite 18, Zeile 16 -Seite 21, Zeile 2 - Seite 24, Zeile 24 -Seite 25, Zeile 7 Seite 27, Zeile 27 -Seite 28, Zeile 3 ---</p>	1
A	<p>WO 92 17259 A (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS INC) 15. Oktober 1992 (1992-10-15) Seite 5, Absatz 2 -Seite 7, Absatz 1 ---</p>	1
A	<p>US 5 491 096 A (SPORTSMAN J RICHARD) 13. Februar 1996 (1996-02-13) Zusammenfassung; Abbildung 1 ---</p>	1
A	<p>WO 92 02818 A (PURDUE RESEARCH FOUNDATION) 20. Februar 1992 (1992-02-20) Seite 6, Absatz 2 Seite 11 -Seite 12, Absatz 1 Seite 21 -Seite 22, Absatz 1 Seite 22, Absatz 3 -Seite 23, Absatz 1 ---</p>	1
A	<p>ONNERFJORD P ET AL: "High sample throughput flow immunoassay utilising restricted access columns for the separation of bound and free label" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A,NL,ELSEVIER SCIENCE, Bd. 800, Nr. 2, 27. März 1998 (1998-03-27), Seiten 219-230, XP004113597 ISSN: 0021-9673 Zusammenfassung; Abbildung 1 -----</p>	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 00/08919

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9933862 A	08-07-1999	US 6077940 A AU 1814599 A EP 1042358 A	20-06-2000 19-07-1999 11-10-2000
WO 9202815 A	20-02-1992	AU 654503 B AU 8530691 A EP 0548178 A JP 6500396 T	10-11-1994 02-03-1992 30-06-1993 13-01-1994
WO 9320449 A	14-10-1993	AU 3936993 A DE 69319593 D DE 69319593 T EP 0632895 A JP 7505477 T	08-11-1993 13-08-1998 17-12-1998 11-01-1995 15-06-1995
WO 9701755 A	16-01-1997	EP 0835446 A JP 11509314 T	15-04-1998 17-08-1999
WO 9217259 A	15-10-1992	AT 147281 T AU 647929 B AU 1768292 A DE 69216520 D DE 69216520 T EP 0533909 A JP 6500402 T US 5234586 A	15-01-1997 31-03-1994 02-11-1992 20-02-1997 24-04-1997 31-03-1993 13-01-1994 10-08-1993
US 5491096 A	13-02-1996	KEINE	
WO 9202818 A	20-02-1992	AU 8654891 A	02-03-1992

THIS PAGE BLANK (USPTO)